

J. Agrisains 6 (2) : 81-86, Agustus 2005

ISSN : 1412-3657

## UJI LOPAT BAKTERI PATOGEN DARI BEBERAPA TANAMAN

Oleh  
Asrul \*)

### ABSTRACT

Several bacteria isolates obtained from paddy rice plants, banana plants, potato tubers, carrot tubers and soybean seeds were grown on NA, CPG and King's B media for examination of their physiological characteristics using LOPAT test. The tests lead to the indication that each isolate was the species of bacteria that was known to cause disease on the corresponding plants. Hypersensitivity tests, however, showed that only banana and potato isolates were pathogenic on tobacco plants.

**Key words** : LOPAT, bacteria, plant, hypersensitive.

### ABSTRAK

Isolat-isolat bakteri yang diisolasi dari beberapa tanaman seperti padi, pisang, kentang, umbi wortel dan biji kedelai di deteksi pada medium NA, CPG dan King's B. Semua isolat yang diperoleh di uji sifat-sifat fisiologi dan biokimianya melalui uji LOPAT. Hasil percobaan menunjukkan bahwa semua isolat bakteri yang diuji adalah bakteri patogen dari masing-masing tanaman yang diisolasi. Namun pada uji hipersensitif, hanya bakteri yang berasal dari pisang dan kentang yang bersifat patogen pada tanaman tembakau, sementara isolat bakteri lainnya tidak bersifat patogen pada tanaman tersebut.

**Kata Kunci** : isolat, uji lopat, patogen

### I. PENDAHULUAN

Sifat merusak dari suatu penyakit bakteri patogen, salah satunya disebabkan oleh luasnya kisaran inang dari bakteri patogen penyebabnya. Hal ini menyebabkan variasi patogenik dalam jenis yang sangat besar. Oleh karena itu informasi tentang ekologi penyakit dan variasi pada patogen sangat penting dalam menentukan strategi pengendalian penyakit (Persley *et al.*, 1985). Klasifikasi untuk

menentukan ras dan biovar sering memberikan informasi yang cukup untuk meramalkan kisaran inang dan beberapa tindakan pengendalian yang cocok untuk strain yang bersangkutan (Hayward, 1994).

Untuk mengetahui ras dan biovar patogen tersebut maka perlu dilakukan pengujian tentang sifat fisiologi dan biokimia bakteri dan patogenitasnya terhadap tumbuhan. Pengujian sifat fisiologi dan biokimia ini dapat pula mengelompokkan bakteri pada species yang sesuai.

Dasar pengelompokkan utama untuk membedakan bakteri patogen tumbuhan dan bukan bakteri

\* Staf Pengajar pada Program Studi Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Tadulako, Palu

tumbuhan dilakukan melalui uji LOPAT (Levan, Oksidasi, Potato, Arginin dan Tobacco) (Fahy dan Hayward, 1983).

Reaksi hipersensitif merupakan mekanisme pertahanan tanaman terhadap invasi patogen. Adapun reaksi yang terjadi diantaranya adalah meningkatnya permeabilitas membran sel, meningkatnya respirasi, akumulasi dan oksidasi senyawa fenol dan pembentukan fitoaleksin (Agrios, 1997). Kemudian dilanjutkan dengan terjadinya pengeringan dan kematian sel inang disekitar tempat invasi, selanjutnya patogen akan terisolasi dari jaringan yang hidup dengan adanya pembatas berupa sel yang telah mati kemudian daerah tersebut akan terpotong (Fahy dan Hayward, 1983). Reaksi hipersensitif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah bakteri-bakteri yang diuji merupakan bakteri patogen tumbuhan. Hipersensitif yaitu respon tanaman yang terinfeksi patogen berupa kematian sel-sel jaringan tanaman inang (Kerr dan Gibb, 1997).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan pengujian beberapa bakteri melalui uji LOPAT untuk mengetahui apakah bakteri yang diuji bersifat patogen atau bukan patogen pada tanaman tembakau.

## II. BAHAN DAN METODE

Bahan percobaan yang digunakan adalah biakan murni bakteri yang diisolasi dari bonggol pisang dan umbi kentang, padi, wortel dan biji kedelai, media CPG, King's B, NA, KOH 3%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 %, tanaman tembakau, kertas saring, reagensia *Kovac's Oksidase*, air steril, yodium, nigrosin (tinta cina) alkohol 70 %, dan kloroform.

Isolat bakteri diambil dengan cara mengamati gejala tanaman yang sakit. Bagian tanaman yang sakit dibersihkan dengan alkohol 70 %, lalu dipotong kecil-kecil berukuran  $\pm$  5 mm. Potongan kecil dicuci dengan air steril selama 30 detik kemudian ditiriskan di atas kertas tissue, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml air steril. Tunggu selama 5 – 10 menit kemudian digojog sampai air kelihatan cukup keruh akibat keluarnya massa bakteri dari jaringan potongan pada tanaman yang sakit. Secara aseptis suspensi bakteri digoreskan pada media NA, CPG dan King's B dengan jarum ose dan diinkubasikan selama 24 jam. Setelah koloni bakteri tumbuh, dilakukan pemurnian dengan cara memindahkan koloni bakteri menggunakan jarum ose ke media agar miring dalam tabung reaksi secara aseptis. Untuk isolasi bakteri dari benih kedelai, digunakan metode perendaman benih yang telah dimodifikasi.

Bakteri yang akan diuji dideterminasi dengan melakukan pengujian sifat-sifat fisiologi dan biokimia melalui uji LOPAT yang mengacu pada metode yang dideskripsikan oleh Fahy dan Persley (1983) sebagai berikut :

### a. Pembentukan Levan

Medium yang digunakan yaitu NA + 5% sukrosa dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Biakan murni diinokulasikan dalam medium dan diinkubasikan pada suhu 27°C selama 2 – 5 hari. Reaksi positif ditunjukkan oleh koloni pada medium yang sebelumnya tembus cahaya menjadi tidak tembus cahaya,

berkilau, mucoid / berlendir yang berubah menjadi bentuk kubah. Koloni yang diinokulasi biasanya berdiameter 3 – 5 mm setelah 2 hari inkubasi dan 5 – 7 mm setelah 3 hari inkubasi (Fahy dan Hayward, 1983).

b. Uji Oksidasi (Kovac's Oxydase)  
 Satu ose biakan bakteri yang berumur 24 – 48 jam digoreskan pada kertas saring yang telah diperlakukan dengan *Kovac's Oxydase*. Apabila dalam waktu 10 detik, pada spot dimana ada goresan kertas berubah warna menjadi ungu maka hasilnya positif.

c. Potato Soft Rot  
 Buat suspensi 10 ml pada tabung reaksi dengan air steril. Umbi kentang dipotong tipis, dicuci dengan air mengalir, letakkan 2 potong umbi tipis pada cawan petri besar yang telah diberi alas kertas filter steril. Permukaan 2 potongan umbi dibuat luka goresan dengan pisau steril. Luka goresan pada 1 potongan ditetesi suspensi bakteri 1 ml sedang potongan lainnya ditetesi air steril sebagai kontrol. Jaga kelembaban dalam cawan petri dengan membasahi kertas filter dengan air steril. Umbi yang sudah ditetesi suspensi, diinkubasikan pada suhu kamar dan diamati setiap hari sampai muncul gejala.

d. Hidrolisis Arginin  
 Medium *Thornley's ZA* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, selanjutnya disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Biakan murni bakteri yang berumur 48 jam diambil dengan menggunakan

jarum preparat, ditusukkan pada medium yang ditutup dengan 3% *agar air* yang dingin dan diinkubasikan pada suhu 27°C. Tes positif bila medium berubah menjadi merah dalam waktu 4 – 7 hari.

e. Reaksi Hipersensitif  
 Pengujian dilakukan untuk mengetahui virulensi patogen terhadap tanaman tembakau. Uji reaksi hipersensitif dilakukan dengan menggunakan tanaman tembakau kultivar *White Burley*. Biakan kelima isolat patogen yang berumur 24 jam dibuat suspensi dalam air steril sampai keruh. Selanjutnya suspensi bakteri tersebut diinokulasikan pada daun tembakau. Reaksi yang muncul diamati sampai 10 hari setelah perlakuan (Klement *et al*, 1990).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji LOPAT dari isolat bakteri yang diisolasi dari beberapa tanaman disajikan pada tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Sifat-Sifat Fisiologi dan Biokimia dari Lima Isolat Bakteri yang Diperoleh Melalui Uji LOPAT.

Sifat-sifat bakteriologi	Isolat Bakteri				
	1	2	3	4	5
Produksi Levan	+	+	+	-	+
Kovac's Oksidase	-	+	+	-	-
Potato Sof Rot	-	-	+	-	-
Hidrolisis Arginin	-	-	-	+	-
Reaksi Hipersensitif	-	+	+	-	-

Keterangan :

- 1 = isolat bakteri dari padi
- 2 = isolat bakteri dari bonggol pisang
- 3 = isolat bakteri dari umbi kentang
- 4 = isolat bakteri dari umbi wortel
- 5 = isolat bakteri dari biji kedelai
- + = reaksi positif
- = reaksi negatif

Isolat bakteri yang diperoleh dideterminasi dengan melakukan pengujian sifat-sifat fisiologi dan biokimia bakteri melalui uji LOPAT dengan hasil sebagai berikut :

Levan atau polifruktose adalah kapsul ekstraseluler yang diproduksi melalui aktivitas dari enzim levan sukrose. Sebagian besar *Pseudomonas* kelompok fluoresen menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon untuk menghasilkan enzim ini (Fahy dan Hayward, 1983 dalam Fahy dan Presley, 1983).

Koloni yang terbentuk pada medium NA (ditambah sukrosa 5%) adalah transparan sampai tidak tembus cahaya, berkilau, mucoid, cembung seperti bentuk kubah. Koloni biasanya berdiameter 3 – 5 mm setelah 2 hari dan 5 – 7 mm setelah 3 hari inkubasi (Fahy dan Hayward, 1983).

Hasil pengujian terhadap isolat 4 menunjukkan koloni tidak berbentuk cembung (kubah), berarti isolat yang diuji tidak ada aktifitas enzim *levan sukrase* yang memproduksi *polifruktose*. Sebaliknya, isolat 1, 2, 3 dan 5, koloninya berbentuk kubah yang menunjukkan adanya aktifitas enzim *levan sukrase*.

Pada pengujian oksidase yang menggunakan uji *kovac's oxydase*, kertas filter Whatman No. 1 dicelup dengan 1% larutan *tetramthyl paraphenylene diamine dihidrorochlorida* kemudian dikeringanginkan (Fahy dan Hayward, 1983), isolat 2 dan 3 bereaksi positif sedangkan isolat 1, 4 dan 5 bereaksi negatif. Reaksi positif ditunjukkan dengan

munculnya warna ungu pada goresan koloni bakteri pada kertas filter. Fahy dan Hayward (1983) menyatakan bahwa reaksi positif terdapat pada beberapa *Pseudomonas*.

Mekanisme dari uji oksidase belum sepenuhnya diketahui, akan tetapi ada beberapa bukti yang menunjukkan bahwa adanya *cytochrom tipe c* berhubungan dengan reaksi positif. Berdasarkan pengujian spektrum absorpsi terhadap beberapa bakteri oksidase negatif menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki *cytochrom tipe b*, bukannya *cytochrom tipe c* yang terdapat pada bakteri oksidase positif (Fahy dan Hayward, 1983).

*Cytochrom oksidase* mempunyai kemampuan untuk mengoksidase *paraphenylenediamine* ke endophenol. Enzim ini secara mudah dapat dideteksi dengan meneteskan larutan *paraphenylenediamine* dioksidasi menjadi indophenol. Hasil positif pada reaksi ini akan tampak berwarna ungu. Bakteri aerob dan beberapa bakteri fakultatif aerob memberi reaksi positif kuat (Salle, 1961).

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui bakteri yang dapat menghasilkan enzim pektinase, yang dapat mendegradasi pektin pada umbi kentang dalam cawan petri besar yang dilapisi kertas filter.

Hasil inokulasi lewat luka pada umbi wortel dengan isolat 1, 2, 4 dan 5 kecuali isolat 3, menunjukkan tidak adanya gejala busuk lunak seperti lendir yang berwarna krem sampai kelabu dan pada umbi tidak tampak kebasah-basahan. Diduga disebabkan biakan

bakteri yang digunakan sudah berada pada fase logaritmik sehingga bakteri kurang mampu menghasilkan enzim *pektinase*. Sebagaimana diketahui bahwa *R. solanacearum* dan *E. carotovora* dapat menghasilkan enzim *pektinase* (Husain dan Kelman, 1958 ; Semangun, 1996). Enzim ini mendegradasi pektat penyusun lamela tengah dinding sel . Degradasi dinding sel menyebabkan sel mudah pecah kemudian cairan isi sel keluar dan terjadi infeksi oleh patogen sehingga membentuk gejala busuk basah. Pada umumnya bakteri *E. carotovora* masuk ke tubuh inang melalui luka maupun lentisel. Lentisel terdapat pada bahan tanaman yang berupa umbi, dengan demikian gejala busuk lunak pada kentang yang terjadi dengan cepat dan parah disebabkan penetrasi bakteri yang tidak hanya melalui luka tetapi juga lentisel.

Hidrolisis Arginin adalah pengujian yang bertujuan untuk mengetahui adanya 2 enzim yang memungkinkan *Pseudomonas* tertentu tumbuh di bawah kondisi anaerob. Enzim pertama yaitu *desmidase arginin* yang mendegradasi arginin menjadi citrulin +  $\text{NH}_3$ , dan enzim kedua adalah *ureidase citrulin* yang mengubah citrulin menjadi ornithin +  $\text{CO}_2$  +  $\text{NH}_3$  (Schaad, 2001). Enzim ini menghasilkan ATP oleh adanya perubahan dari arginin ke ornithin dengan turunan dari  $\text{CO}_2$  dan  $\text{NH}_3$  (Sands, 1990 dalam Klement, 1990). Amonia yang dihasilkan dari arginin dibawah kondisi anaerob menyebabkan perubahan alkalin dalam medium (Sands, 1990).

Reaksi alkalin positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna yang lebih merah dibandingkan dengan warna merah muda dari kontrol (Fahy dan Haywad, 1983 dalam Fahy dan Presley, 1983). Hasil percobaan menunjukkan tidak adanya perubahan warna medium menjadi lebih merah dari pada kontrol. Ini berarti bahwa isolat 1, 2, 3 dan 5 tidak bersifat alkalin dalam kondisi anaerob.

Pada hasil uji reaksi hipersensitif yang menggunakan daun tembakau, isolat 2 dan 3 menunjukkan gejala nekrosis pada daerah suntikan dalam waktu 48 jam. Terdapat gejala water soaking, yaitu gejala yang menghasilkan kebasah-basahan pada daun dan bila dilihat dibawah sinar matahari tampak tembus cahaya, muncul setelah 24 jam diinokulasi. Menurut Cook dan Stall (1977), gejala water soaking disebabkan terjadinya kehilangan dengan cepat elektrolit pada daun yang diinokulasi dan penurunan populasi bakteri *in vivo*, kemudian berkembang menjadi nekrosis tahap awal. Selanjutnya beberapa hari kemudian gejala nekrosis berkembang atau menyebar luas ke bagian daun lain seperti tulang daun dan menimbulkan gejala daun layu. Hal ini sesuai dengan pendapat Kerr dan Gibb (1997) bahwa apabila bakteri yang diuji berupa bakteri patogen maka akan terjadi nekrosis pada daun tembakau, dimana terjadi hubungan yang compatible antara patogen dan tembakau. Sedangkan isolat 1, 4 dan 5 tidak menunjukkan gejala nekrosis pada daerah suntikan sampai satu minggu setelah perlakuan. Daun hanya menunjukkan kebasah-

basahan segera setelah diinfiltrasi inokulum bakteri dan setelah 24 jam, bagian daun tersebut menjadi segar kembali dengan warna hijau seperti semula. Bakteri tidak dapat berkembang di dalam daun tembakau karena sel bakteri inkompatibel dengan sel daun tembakau. Ini berarti bakteri tersebut bukan merupakan bakteri patogen tumbuhan pada tembakau.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji LOPAT, isolat bakteri dari pisang dan kentang merupakan bakteri patogen pada tembakau sementara isolat bakteri dari umbi wortel, padi dan biji kedelai bukan merupakan bakteri patogen pada tembakau.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N., 1988. *Plant pathology*. 3<sup>d</sup> ed. Academic Press. Ins. New York
- Cook, A.A. and R.E. Stall, 1977. *Effect of water soaking on response to xanthomonas vesicatoria in pepper leaves*. *Phytopathology* 67 : 1101 – 1103
- Edden-Green, S.J., 1994. *Diversity of pseudomonas solanacearum and related bacteria in South Asia : New direction for Moko Disease*. 24 – 43p. In : A.C. Hayward and G.L. Hartman. *The Disease and its Causative Agent Pseudomonas solanacearum*. Biddles Ltd. Gilfor UK.
- Fahy, P.C. and Lloyd, A.B., 1983. *Pseudomonas: The Fluorescent Pseudomonas*. In: Fahy, P.C. and G.J. Persley. *Plant Bacterial Disease, a Diagnostic Guide*. Academic Press. 151p.
- Hayward, A.C., HM. L-Nashar, U. Nydegger and L. Delindo, 1990. *Variation in nitrat metabolisme in biovars of pseudomonas solanacearum*. *Appl. Bacterial*. 69:269-280.
- Husain and Kelman, 1958. *The role of pectic and cellulolytic enzym in pathogenetif by pseudomonas solanacarum*. *Phytopathology* 48 : 377 – 379.
- Kerr, A. and K. Gibb, 1997. *Bacteria and phytoplasma as plant parasites*. In : *Plant Pathogens and Plant Disease*, J.F. Brown and H.J. Ogle (eds), Australian Plant Pathology Society, Armidale, 86 – 103 p.
- Klement Z., Mavridis, A., Rudolph K, Vidacer, A., Perombedon, M.C.M., Moore, L.W., 1990. *Inoculation of plant tissues*. P.95 – 120 p. In : Klement, Z.K., Rodolph and D.C. Sands. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Budapest.
- Lelliot, R.A. and D.E. Stead, 1987. *Methods in plant pathology : methods for the diagnosis of bacterial disease of plant*. Blackwell Scientific Publication, London.
- Perley, G.J., 1985. *Ecology of pseudomonas solanacearum the caused agent bactrial wilt*. 71 – 75p. In : Persley, G.J. (ed). *Bactrial Wilt Disease in Asia and the South Pasific*. ACIAR, Los Banos, Philippines.
- Salle, A.J., 1961. *Fundamental principles of bacteriology*. Mc. Graw-Hill. Book Company. Inc. New York, 782p.
- Sands, D.C., 1990. *Physiological criteria determinative test*. In : *Methods in Phytobacteriology*, Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands (eds), Akademiai Kiado, Budapest, 134 – 141p.
- Semangun, H., 1996. *Pengantar ilmu penyakit tumbuhan*. UGM Press, Yogyakarta.